

## PRODUCTION OF HYDROGEN GAS

**Patent number:** JP8294396  
**Publication date:** 1996-11-12  
**Inventor:** TOYA TAISUKE  
**Applicant:** EBARA CORP;; EBARA RES CO LTD  
**Classification:**  
**- international:** C12P39/00; C02F3/34; C12P3/00;  
C02F3/28; C12P39/00; C12R1/145;  
C12R1/01; C12P39/00; C12R1/145;  
C12R1/89; C12P3/00; C12R1/145;  
C12R1/01; C12R1/89  
**- european:**  
**Application number:** JP19950124562 19950426  
**Priority number(s):** JP19950124562 19950426

**Report a data error here**

### Abstract of JP8294396

**PURPOSE:** To provide a completely new biological method for producing hydrogen, capable of stably producing a large amount of hydrogen. **CONSTITUTION:** In this method for producing hydrogen gas from various organic waste products, a microorganism group belonging to the genus *Clostridium* which is a strictly anaerobic heterotrophic hydrogen-producing bacterium is mixed and cultured with a microorganism belonging to the genus *Chromatium* of a purple sulfur bacterium which is a hydrogen-producing photosynthetic microorganism and/or the genus *Oscillatoria* which is blue-green alga under anaerobic dark conditions. The mixing culture can be carried out in a vacuum fermentation tank or a slightly anaerobic vacuum fermentation tank.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-294396

(43) 公開日 平成8年(1996)11月12日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 39/00			C 1 2 P 39/00	
// C 0 2 F 3/28	Z A B		C 0 2 F 3/28	Z A B Z
3/34	Z A B		3/34	Z A B A
				Z A B Z
C 1 2 P 3/00			C 1 2 P 3/00	Z
審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 12 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-124562

(22) 出願日 平成7年(1995)4月26日

(71) 出願人 000000239

株式会社荏原製作所

東京都大田区羽田旭町11番1号

(71) 出願人 000140100

株式会社荏原総合研究所

神奈川県藤沢市本藤沢4丁目2番1号

(72) 発明者 遠矢 泰典

東京都大田区羽田旭町11番1号 株式会社

荏原製作所内

(74) 代理人 弁理士 吉嶺 桂 (外1名)

(54) 【発明の名称】 水素ガス生産方法

(57) 【要約】

【目的】 安定して大量の水素を生産できる全く新規な生物学的水素生産方法を提供する。

【構成】 各種の有機性廃棄物から水素ガスを生産する方法において、該有機性廃棄物中、偏性嫌気性の従属栄養性水素生産菌であるクロストリジウム (Clostridium) 属に属する微生物群と、水素生産性光合成微生物である紅色硫黄細菌クロマチウム (Chromatium) 属及び／又は藍藻であるオシラトリア (Oscillatoria) 属に属する微生物とを、嫌気暗条件下で共生せしめ、混合培養することとしたものであり、前記混合培養は減圧発酵槽、微嫌気減圧発酵槽で行うことができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 各種の有機性廃棄物から水素ガスを生産する方法において、該有機性廃棄物中で、偏性嫌気性の従属栄養性水素生産菌であるクロストリジウム (*Clostridium*) 属に属する微生物群と、水素生産性光合成微生物である紅色硫黄細菌クロマチウム (*Chromatium*) 属及び／又は藍藻であるオシラトリア (*Oscillatoria*) 属に属する微生物とを、嫌気暗条件下で共生せしめ、混合培養することを特徴とする水素ガス生産方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、水素ガス生産方法に係り、特に、有機性廃棄物を基質として、嫌気性の従属栄養性水素生産菌群と光合成微生物の混合共生培養により水素ガスを生産する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 化石燃料に代替するエネルギー源として、クリーンな水素エネルギーが注目され、安価で、大量生産を目的とした水素生産方法が研究されているが、その主流は化学的及び／又は電気化学的方法による技術が中心となっており、結局、化石燃料によるエネルギー供給が不可欠であるために、環境汚染を招いている。このような観点から、化石燃料に依存せず、かつ、環境汚染を惹起しない微生物学的な水素ガス生産技術の研究開発が精力的に行なわれてきている。水素ガスを生産する微生物は、光合成微生物と非光合成微生物とに大別される。水素ガスを生産する光合成微生物としては、光エネルギーの照射下で水を分解し、酸素を発生する光合成微生物（微細藻類）で次のような属種があげられる。

\*緑藻類 ・ クラミドモナス (*Chlamidomonas*) 属

・ クロレラ (*Chlorella*) のある属種

・ セネデスムス (*Scenedesmus*) 属

\*藍藻類 ・ オシラトリア (*Oscillatoria*) 属、

・ シネゴコッカス (*Synechococcus*)

【0003】 また、他の一つは、有機物を資化する過程で余剰の水素をガスとして放出する光合成細菌であり、その主たるものとして次の属種があげられる。

\*非紅色硫黄細菌 ・ ロドスピリラム (*Rhodospirillum*) 属

・ ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*)

\*紅色硫黄細菌 ・ クロマチウム (*Chromatium*) 属

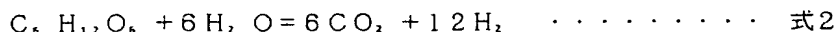
・ チオカプサ (*Thiocapsa*) 属

光合成微生物による水素生産及び／又は有機性排水処理に関する研究は、地球環境問題が顕在化する以前の1975年以来精力的に行なっており、評価すべき研究成果\*



(標準自由エネルギー = +184 kJ/mol)

式1から容易に理解できるように、グルコース1モルか※



この水素生産量格差の最大の原因は、光合成細菌による

\*を上げている。海洋性光合成細菌であるクロマチウム (*Chromatium*)、或いは海洋性藍藻に属するオシラトリア (*Oscillatoria*) のある種の菌株を用いて、光合成微生物の高分子ゲルによる固定化技術による安定した連続水素生産、蜜柑ジュース製造排水（濃厚排水の処理は不能）の処理と水素生産、或いは明暗同調培養による水素生産と窒素の除去技術などが業績として上げられ、これらの研究成果は「光合成微生物による水素生産」（鈴木周一編；バイオマス・エネルギー変換、講談社・サイエンティフィック、pp. 194~228 (1983)) に集大成されている。

【0004】 然し、この膨大で、貴重な研究成果が過去から現在にいたる過程で得られているにも拘らず、現時点で実用化規模で稼働している水素生産施設、或いは排水処理施設は存在しない。

その主な理由は次の通りであると思われる。

① 光合成微生物の増殖には、太陽エネルギーの連続的な照射が不可欠である。

② 光合成細菌の培養には、通常、広大な面積を必要とする。

③ 水素還元酵素であるニトロゲナーゼの失活、ヒドロゲナーゼの安定化のための固定化技術、その他が必要であり、技術的な困難が伴う。

④ 必要面積を縮小するための濃厚培養技術、及び培養装置が必要である。（コストアップ要因となる）

⑤ 太陽光の集光、培養槽内への光の均等分散（エネルギー利用効率の向上）。

【0005】 この光合成細菌による水素ガス生産に対して、非光合成細菌による水素生産の研究も、広範に行なわれている。この種の水素生産菌は偏性、或いは通性嫌気性菌に属し、その代表的な細菌は前記の通りであるが、従属栄養的な増殖の過程で、有機物を分解し、この過程で生ずる余剰の電子をヒドロゲナーゼで還元する事により水素を生産し、エネルギー生産に伴う還元力の調整を水素生産により自動的に行なっている。この嫌気性の従属栄養性水素生産菌は、有機物を分解し、結果として水素を生産できるので、高濃度の有機性廃棄物、その他のバイオマスをエネルギーとしての再資源化できると同時に処理・処分が可能であり、将来性のある環境保全技術になり得るものである。然し、現段階では、この従属栄養性水素生産菌による水素生産にも下記のような欠点がある。

【0006】 嫌気性菌による有機物（グルコースで代表させる）からの水素生産の発酵反応式は通常式1で表される。

※ら生産される水素は4モルに過ぎず、光合成細菌の水素生産菌12モル（式2）に対して極めて少量である。

水素生産では、この反応の推進力となるアデノシン三リ

ン酸 (ATP) が、少なくとも太陽エネルギーが供給されている限り、理論的には無限大であるのに対して、嫌気性細菌による有機物からの水素生産は、有機物を最終的に水と炭酸ガスまで分解するのに  $184 \text{ kJ/mol}$  のエネルギーが不足する。従って、嫌気性細菌による水\*

$$\text{不足 ATP 量} = 184 \text{ kJ/mol} \div 30.5 \text{ kJ/mol} \cdot \text{ATP}$$

$$\approx 6.0 \text{ mol} \cdot \text{ATP/mol} \cdot \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdots \text{式 3}$$

嫌気性細菌 (水素生産菌) による ATP 生産量は、理想的条件でグルコース 1 モル当り解糖系で 4 モル、酸発酵工程で 3 モルの計 7 モルであり、何らかの手段・方法で ATP を補填・補完しない限り、水素発酵はこれ以上正方向に進行せず、低級脂肪酸が蓄積した状態で動的平衡状態に達する。この問題を解決するために、次のような研究が知られている (水素発酵; バイオマスから水素生産、微生物、Vol. 3, No. 6, pp. 42~49, 1987)。即ち、嫌気性細菌は光照射が不要であり、強力な有機物分解能を持っており、バイオマスから水素生産ができる。また、通気も必要なく、大型のタンクで培養できるという利点がある。然し、有機物の完全な分解ができず、有機酸を蓄積することが欠点であり、水素発生率も低い。

【0008】これに対して光合成細菌は一般に有機物の資化性能は低いが、光エネルギーを利用できるため、有機物を完全に水と炭酸ガスにまで分解できる。また、有機酸等嫌気性発酵の生産物を好んで利用する。このように、嫌気性細菌と光合成細菌は基質の代謝機能において相補的關係にあるので、これらの 2 種類の細菌を混合して用いれば基質の完全分解が可能と考えられる。このような発想により、クロストリジウム プチリカム (*Clostridium butyricum*) とロドシュードモナス スファエロイデス (*Rhodospseudomonas sphaeroides*) を混合培養すると、グルコース 1 モルから 7 モルの水素が回収できたと報告している。一方、混合培養ではなく、クロストリジウム プチリカム (*Clostridium butyricum*) の発酵廃液を光合成細菌に与えた場合は、合計でも 4 モル以下の水素しか得られなかったことから、混合培養においては、互いの細菌の水素発生効率を高める相乗効果も生じていると考えられると報告している。然し、この発想による混合培養での水素生産量は最高でも 7 モルであり、光合成細菌の 12 モルに比較すると、まだ可成りの格差がある。

【0009】また、それ以前にも嫌気性細菌と光合成細菌の混合培養による水素生産の実験を行い、次のような結果を得ている。即ち、基質としてグルコース (+ 各種必要成分を加えた人工培地) を用い、嫌気性水素生産菌としてクロストリジウム プチリカム (*Clostridium butyricum*) IFO13949、光合成細菌として新しく発見した非硫黄光合成細菌ロドシュードモナス (*Rhodospseudomonas*) SP・RV (*Rhodospseudomonas capsulata*・

\* 素発酵は完全な吸エルゴン反応であり、不足 ATP 量に対応する分だけ発酵液中に各種の低級脂肪酸が蓄積し、そのために水素生産量が少ないだけでなく、発酵消化液の 2 次処理を必要とする。

【0007】

養温度  $30^\circ\text{C}$ 、さらに嫌気性条件下で  $10 \text{ klux}$  の光照射 (嫌気明条件下) を行いながら混合培養し、計算上、1 モルのグルコースから 7 モル~9 モルの水素を得ている (J. Ferment. Technol., Vol. 62, No. 6, p. 531~535, 1984、特公昭 63-49994 号公報)。何れにしても、有機性廃棄物などのバイオマスから光合成微生物を介在せしめて水素生産を行なう場合には、人工的な光エネルギー使用は水素生産コストの面から実用性は期待できず、さらに、光エネルギーを太陽光に依存する場合には、恒久的に安定した光エネルギーを供給することは現実的に不可能である。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】以上詳述したように、有機性廃棄物などのバイオマスを処理すると共に、水素生産をも達成できる水処理技術、有機性廃棄物の再資源化技術の出現が強く要望されているが、現在のところ実用的な技術は開発されていない。本発明は、上記従来技術の問題点を解消し、安定して大量の水素を生産できる全く新規な発想による革新的な生物学的水素生産方法を提供することを課題とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、本発明では、各種の有機性廃棄物から水素ガスを生産する方法において、該有機性廃棄物中で、偏性嫌気性の従属栄養性水素生産菌であるクロストリジウム (*Clostridium*) 属に属する微生物群と、水素生産性光合成微生物である紅色硫黄細菌クロマチウム (*Chromatium*) 属及び/又は藍藻であるオシラトリア (*Oscillatoria*) 属に属する微生物とを、嫌気暗条件下で共生せしめ、混合培養することを特徴とする水素ガス生産方法としたものである。前記方法において、混合培養は減圧発酵槽あるいは微嫌気減圧発酵槽で行なうことができる。

【0012】このように、本発明は、各種の有機性廃棄物を基質として嫌気性の従属栄養性水素生産菌により、解糖系と TCA サイクル系で水素を生産し、同時に生成される低級脂肪酸を光合成細菌であるクロマチウム (*Chromatium*) 属に属する細菌群及び/又は藍藻の一種である水素生産性藻類オシラトリア (*Oscillatoria*) 属に属する藍藻群を嫌気暗条件、即ち、光エネルギーを供給しない環境条件下で混合共生培養し、この嫌気的環境下で生産される ATP により前記の低級脂肪酸を資化させ、水素に転換し、有機性廃棄物から光エネルギーなしで、安定して大量の水素を生産するシステムである。

【0013】本発明方法においては、通常の土壌、各種の有機性廃水及び／又は各種汚泥など有機物を濃厚に含む有機性廃棄物に、野性的に生息している偏性嫌気性の従属栄養性水素生産菌の存在に着目し、該菌の機能を有効に利用して、有機性廃棄物の主要構成成分である繊維質、炭水化物、脂肪、蛋白質及び／又は低級脂肪酸などの有機物を解糖系、TCAサイクル系で分解、低分子化する事を第一の特徴としている。この分解過程で菌体内に生じた余剰電子はヒドロゲナーゼによって水素になって水と共に菌体外に運びだされ（水素生産）、エネルギー生産に伴う還元力、還元雰囲気調整をNADの還元型（NADH）を生成する事によって調整している。

【0014】通常の微生物であれば、ミトコンドリアの内部での電流反応によって、即ち、チトクロームによる電子伝達によって電子は酸素に付与されて水を生ずると共に、それに共役して微生物活動、機能の推進力となるATPが適量生成されるが、本発明の主役を演ずる偏性嫌気性の従属栄養性水素生産菌クロストリジウム（Clostridium）属は、電子伝達系としてNAD→FAD→UQは備えているが、チトクローム電子伝達系が欠落している。従って、クロストリジウム（Clostridium）属の細菌群は解糖系、TCAサイクル系におけるATP生産量が基本的に少なく、そのために、水素発酵反応が吸エルゴン反応となり、完全反応を達成するにはエネルギーが不足する。そのため発酵消化液中に低級脂肪酸が蓄積し、水素生産量が光合成微生物に対して30%程度に過ぎない。

【0015】このクロストリジウム（Clostridium）属と光合成細菌がグルコースを基質とした場合の発酵反応式は前記式1及び式2で示したが、クロストリジウム（Clostridium）属による水素発酵では、その反応達成率を100%とするには、標準自由エネルギーとして184 kJ/mol・グルコースが不足し、この熱量は大凡6.0モルATP/モル・グルコースに相当する。本発明の主役として、自然界に広く生息している通性嫌気性従属栄養水素生産菌の代表菌属であるエンテロバクター（Enterobacter）属、或いはクレブシエラ（Klebsiera）属で\*

- ・クロストリジウム（Clostridium）属
- ・メタン細菌

\*両属では、水素に対する感受性が異なり、メタン細菌に対してクロストリジウム（Clostridium）属は可成り敏感であり、水素の存在により活性阻害を受けやすい（全ての微生物類が一般的に水素の害作用を受ける）。

【0018】以上のように、クロストリジウム（Clostridium）属とメタン細菌とは、上記の作用因子に対する感受性に相当の格差があるので、前記したように、本発明でも、常にクロストリジウム（Clostridium）属を優占種とし、確実に、かつ遅延なく水素発酵、水素生産を行なうために、必要により減圧発酵、或いは微嫌気減圧発酵を行なう事が望ましい。この事に関しては、先に出願

\*代替することも考えられるが、この両菌属も電子伝達系に不備があり、前段階でのエネルギー生成反応（分解・異化）である発エルゴン反応から得られる自由エネルギーを、エネルギー消費反応である吸エルゴン反応過程に伝達する中心的役割を果たしている高エネルギー物質ATPの生産量が不足し、目的とする物質の生産、即ち水素生産量が著しく制限される。

【0016】また、通性嫌気性細菌を水素生産の目的に使用すると、余剰電子のはけ口として機能しているヒドロゲナーゼの酵素学的安定化を阻害し、さらに、酸素混入・混在によりニトロゲナーゼの活性が不可逆的に阻害される。また、重要な要因として考慮すべき事は、本発明の対象とする各種の有機性廃棄物は、自然環境に放置された状態で、本発明の一方の主役であるクロストリジウム（Clostridium）属の細菌群だけが単独で生態系を構成していることはあり得ず、各種の嫌気性細菌、好気性細菌が共生・共存しており、所謂混合培養系を構成している事である。本発明と直接関連する重要な、その存在を無視し得ない細菌にメタン菌があり、従属栄養性水素生産菌の培養条件によっては、混合培養系でメタン菌が優占種となり、本発明が本来の目的とする水素生産が阻害される恐れがある。

【0017】然し、クロストリジウム（Clostridium）属とメタン細菌とは自然環境の中で生活し、かつ増殖するのに必要な最適条件に可成りの格差があることが実験的に実証・確認されており、この条件格差を人為的に制御することにより、本発明の目的とするクロストリジウム（Clostridium）属を混合培養系の中で常に優占種として増殖せしめる事ができる。その制御因子としては次の事があげられる。

\*クロストリジウム（Clostridium）属とメタン細菌の間では増殖速度に可成りの格差がある。

\*両属の間には、至適pH範囲に可成りの格差があり、クロストリジウム（Clostridium）属はpH5.5～5.8、メタン細菌はpH7.8前後である。

\*両属の間には、混合培養液（発酵環境）の好適酸化還元電位に可成りの格差がある。

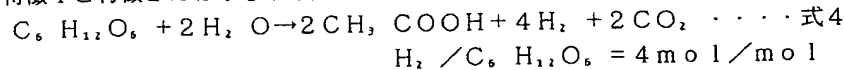
-100～-200 mV.

-350～-450 mV.

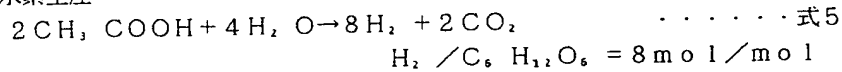
した特願平5-195329号に詳細に記載してある。本発明の第二の特徴は、有機性廃棄物を基質として偏性嫌気性の従属栄養水素生産菌クロストリジウム（Clostridium）から水素を生産する方法において、該菌の足らざる能力（ATP生産能力）を補完するために特定の光合成微生物を一定の比率で混合共生培養し、光合成微生物が嫌気暗条件で生産するATPを利用して、発酵消化液に残存している各種の低級脂肪酸を水素に転換し、総水素生産量として光合成微生物が光エネルギー供給条件下（嫌気明条件）で達成し得る水素生産量12モル/モル・グルコースに匹敵する水素生産量を確実に確保する方

法を提供する事である。

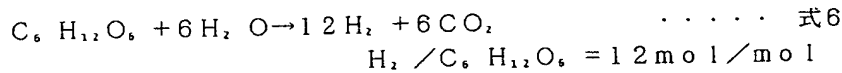
【0019】本発明の特徴1と特徴2における水素発酵\*



\*光合成微生物による水素生産

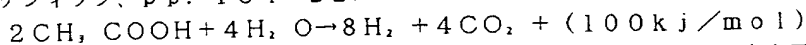


式4、式5より、



【0020】まず第一に、本発明者が偏性嫌気性水素生産菌クロストリジウム (Clostridium) と混合培養すべき相手として光合成細菌に属する紅色硫黄細菌クロマチウム (Chromatium) を選択した理由を説明する。前記した通り、本発明の処理対象となる有機性廃棄物には、通常、可成りの濃度の硫化物が含まれており、従って、この種の有機性廃棄物を生物学的に処理する場合、浄化に関与する微生物は著しく活性阻害を受けるのが宿命であり、前記特公昭63-49997号公報で適用しているロドシュードモナス (Rhodospirillum rubrum) 属に属する光合成細菌も例外ではあり得ない。これに対して、クロマチウム (Chromatium) 属に属する光合成細菌 (紅色硫黄細菌) は硫黄イオン、チオ硫酸イオンなどの、所謂硫化物自身を電子供与体として利用する事が可能であり、酵素ニトロゲナーゼを介在して電子を水素イオンと結合する事により水素を生産し、エネルギー生産に伴う還元力の増加を調整している。

【0021】また、該菌は硫化物に止まらず、通常的光合成細菌と同じようにコハク酸、フマル酸、マレイン酸、酢酸、リンゴ酸糖の低級脂肪酸を電子供与体として水素を発生することができる (鈴木周一編・バイオマス・エネルギー変換; 三井旭、光合成微生物による水素生産、講談社・サイエンスフィク、pp. 194~22※

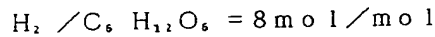
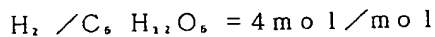


さらに本発明に対して有利な事にクロマチウム (Chromatium) 属は、嫌気暗、即ち光エネルギー照射が行なわれない環境、従って菌体内での光化学系が作動しない状態でも酢酸、ケト・グルコン酸を始め、ある種の高糖類を資化して水素を生産する機能を具備している事である。

【0023】また、低級脂肪酸と、ある種の有機物を嫌気暗条件下で分解する過程、即ち、解糖系とTCAサイクル系 (酸発酵工程) で水素生産による還元力の増大をNADHの生成により調整し、この反応に共役する反応により高エネルギー物質であるATPを生産する事ができる。クロマチウム (Chromatium) の嫌気暗条件下でのATP生産量に関する確たるデータはないが、解糖系及び

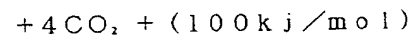
\*の基本となる反応式は次の通りである。

\*クロストリジウム (Clostridium) 属による水素生産



※8、1983/2)。また、同文献によればクロマチウム (Chromatium) 属は酢酸、ビルビン酸等を従属栄養的に好んで資化するが、グルコース、フラクトースなどの炭水化物からは水素を生産することが出来なかったと報告している。有機性廃棄物を基質として水素を生産する場合、光合成細菌が炭水化物を電子供与体として利用できる機能を備えていることは好ましいが、本発明のように有機性廃棄物をクロストリジウム (Clostridium) 属で異化分解すると、発酵消化液に残存するのは酢酸、酪酸、プロピオン酸、或いは蟻酸等の低級脂肪酸であり、此等の低級脂肪酸は十分にクロマチウム (Chromatium) 属の電子供与体となり得るので、クロストリジウム (Clostridium) 属とクロマチウム (Chromatium) 属の混合培養においては後者の細菌が炭水化物を電子供与体として利用できなくても、本発明に対して致命的な要素とはならない。

【0022】光合成細菌は、通常、太陽エネルギーの供給によりATPが理論的に無限に生産されるので、標準自由エネルギーが正となる吸エルゴン反応であっても完全に進行し、例えば酢酸を基質とした場合、次に示すように反応は完結し、理論値の水素と炭酸ガスを生産する。



TCAサイクル系でのATP生産量はその代謝サイクルから推測して3~4ATPと考えるのが妥当である。この数値を基礎にして、クロストリジウム (Clostridium) 属とクロマチウム (Chromatium) 属の混合共生培養 (嫌気暗培養) での全生物反応による理論的なATP生産量 (基質としてグルコースを想定する) と各段階でのATP消費量を計算したのが表1であるが、この計算結果からグルコースを完全分解して12モルの水素を生産するのに必要なATP不足量、及びクロマチウム (Chromatium) 属により補完されるATP量が明確となる。

【0024】

【表1】

	偏性嫌気性水素生産菌クロストリジウム (Clostridium)属		光合成細菌クロマチウム (Chromatium)属	
	CO <sub>2</sub>		CO <sub>2</sub> +NH <sub>3</sub>	2CO <sub>2</sub> +4H <sub>2</sub> 4CO <sub>2</sub> +8H <sub>2</sub>
	発生ガス			
生物反応工程	解糖系 (液化工程)	酸発酵工程 (TCA回路)	水素発酵工程	追加の水素発酵工程
ATP生産量	△4ATP	△3ATP	△4ATP ▼4ATP	△3~△4ATP
ATP消費量	—	—	▼6ATP (過剰分・1ATP)	▼3.2ATP
全生物反応に おけるATP 不足量	2.2ATP mol/mol C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (計算値)		式4 + 184kJ/mol ↓ 式5 + 100kJ/mol (推定)	

\* △ : ATP生産、 ▼ : ATP消費

【0025】表1から容易に理解できるように、クロストリジウム (Clostridium) 属の反応系でのATP生産量は7 mol・ATP/mol・C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>、クロマチウム (Chromatium) 属の反応系でのATP生産量は3~4 ATP、合計10~11 ATPであるのに対して、水素生産の全反応に要するATPは10.2 ATPであり、従って、有機性廃棄物から水素生産する場合、偏性嫌気性水素生産菌と水素生産性光合成細菌クロマチウム (Chromatium) 属を混合培養すれば、有機物の完全分解と理論量の水素を生産する事ができる。本発明者は、淡水性のクロマチウム (Chromatium) 属を長野県下の硫黄泉の湧出水から容易に見出し、また、海産性のクロマチウム (Chromatium) 属を八重山列島の石垣島海岸に漂着している大型海藻 (Macroalgae) の葉面に大量に付着増殖している菌群として採取した。これら自然界に広く分布しており、従って本発明は特定の菌株の性状に依存するものではない。

【0026】本発明者が発見したこの淡水性、海産性のクロマチウム (Chromatium) 属については細菌群としての水素生産能を測定したが、嫌気明条件では2~3 μmol/mg-cell/hrの高い水素生産能力を示した。然し、嫌気暗条件では微量の水素しか生産しなかった。淡水性クロマチウム (Chromatium) 属の嫌気暗条件下での集積培養はATCCのMEDIA HANDBOOKの液体培地から選択し、基本的にはMedia Formulations ATCC37を使用し、有機物成分として酢酸塩3.000g/リットル、酵母抽出液1.500g/リットルを加えた。また、海産性クロマチウム (Chromatium) 属の嫌気暗培養液としては、湘南

海岸の清浄な海水を用い、ATCC37を基礎とする各種成分を前記海水に溶解して滅菌し、培養した。クロマチウム (Chromatium) 属の菌体集積物は、前記の温泉水及び大型海藻の葉面に付着した菌体を物理的に剥離し、遠心分離器 (3,000G、10分間) で濃縮し、それぞれを前記の基礎培養液に接種し、2リットルの嫌気性暗培養槽に培養液1リットルを張込み、気相部の空気を窒素ガスで置換し、30℃で培養した。

【0027】培養当初から成分不明のガスが直ちに発生したが、約10日後からガス発生が激しくなり、ガスクロマトグラフで測定した結果、微量の水素と可成りの炭酸ガス、及び微量の窒素であることが確認された。以上の半定量的所見は、淡水性クロマチウム (Chromatium) 属、海産性クロマチウム (Chromatium) 属の細菌群についてのものであり、純粋に分離した単一菌に関しての所見ではない。然し、実際の濃厚廃水、各種汚泥などの有機性廃棄物を対象としてクロストリジウム (Clostridium) 属とクロマチウム (Chromatium) 属の混合培養系から水素生産を行なう場合には、純粋菌同士の混合培養を行なうよりも、それぞれ、各種の菌種が混合した、所謂細菌群集を混合培養の方が自由度の大きい、また幅のある生態系の共生関係を構築することができ、外部からの環境変動に対して順応性、適応性、抵抗力があり、それぞれの細菌の機能の補完、機能の増幅が期待される。従って、本発明では特定の純粋菌の混合培養を避け、各種細菌群の混合培養法を意識的に選択したものである。

【0028】因みに、前記の淡水性クロマチウム (Chromatium) 属、及び海産性クロマチウム (Chromatium) 属を、それぞれの培養液で培養した結果、次に示すクロマ

チウム (Chromatium) 属の菌種の類縁菌 (近縁細菌) が \* \* 検出された。

\* 淡水性クロマチウム (Chromatium) 属

・クロマチウム テピダム (Chromatium tepidum) (ATCC 43061)

・クロマチウム ビノサム (Chromatium vinosum) (ATCC 17899)

\* 海産性クロマチウム (Chromatium) 属

・クロマチウム ブデリ (Chromatium buderi) (ATCC 25588)

・クロマチウム ビノサム (Chromatium vinosum) (ATCC 35206)

以上、本発明は、偏性嫌気性水素生産菌クロストリジウム (Clostridium) 属と水素生産性光合成細菌クロマチウム (Chromatium) 属のそれぞれの細菌群集を混合培養し、クロストリジウム (Clostridium) 属の単独培養では不足する ATP 生産量を、嫌気暗条件下で光合成細菌クロマチウム (Chromatium) 属と混合培養し、該菌が生産する ATP によって補完することにより、さらに各細菌群集を混合培養することにより、安定してほぼ理論量の水素を生産することができる。

【0029】光合成微生物に属する微細藻類、特に緑藻類、藍藻類の中には水素を生産するものが多く、通常、緑藻類は水素生産にヒドロゲナーゼ、藍藻類はニトロゲナーゼを利用すると云われ、その代表的な属種には次のようなものがある。

\* 緑藻 ・セネデスマス (Scenedesmus)

・クロレラ (Chlorella)

・クラミドモナス (Chlamydomonas)

\* 藍藻 ・アナベナ (Anabaena)

・ノストック (Nostoc)

・オシラトリア (Oscillatoria)

藍藻の多くは他の微細藻類とは異なり、窒素固定能力を有し、窒素ガスが存在しない時のみ光水素生産を行なうと云われる。

【0030】藍藻は基本的には独立栄養的な生き方が主流であるが、同時に従属栄養的な生き方をするものが多く、微細藻類のなかでは特殊な存在として位置づけされている。例えば、

① 無酸素状態で光エネルギーが与えられると、硫化水素を酸化して光合成を行なう。

\* 水素生産能力

・浮遊菌体  $\Delta H_2 = 5.5 \mu\text{mol} / \text{mg} \cdot \text{protein} \cdot \text{hr}$

・固定化菌体  $\Delta H_2 = 220 \sim 300 \text{ml} / \text{g} \cdot \text{cell} \cdot \text{day}$

【0032】この BG 7 は異型細胞を持たず、その水素生成系はニトロゲナーゼとヒドロゲナーゼの両方の酵素に触媒され、大部分の水素生成反応はニトロゲナーゼによって触媒されるが、約 10~20% の水素生成はヒドロゲナーゼによるものと推定されると結論している。また、BG 7 は、従来、水素生産に用いられていたアナベナ (Anabaena) 属、ノストック (Nostoc) 属などに比較して吸収型ヒドロゲナーゼ活性を持たないという特異的な性質があるので、水素生産の面から有利であるという。本発明は、藍藻に嫌気明における水素生産を期待しているのではなく、嫌気暗における ATP 生産に期待す

※② 多くの藍藻は水素分子を酸化し、得られる電子を利用して光合成を行なう。

③ また、グルコースのような有機物を酸化して光合成を行なう能力がある。

④ 酸素が存在しない状態で有機物を酸化分解し、生ずるエネルギーを ATP という形で利用し、過剰分は菌体外に放出し、他の吸エルゴン反応に供給する。

⑤ 藍藻が有機物を酸化分解する過程は、通常の細菌類と同じ代謝経路を取り、例えば嫌気暗の条件では解糖系、TCA サイクル系により有機物を異化代謝し、この過程で ATP を生産し、同時に反応系の酸化還元状態を調整するために NAD (P) H が生産される。

【0031】藍藻類は環境変動に対して順応性、対応性に優れている。これらの中でもオシラトリア (Oscillatoria) はその性能が特に優れており、本発明のクロストリジウム (Clostridium) 属との混合共生培養による水素生産の相手として限らない利点を発現するので、この属種の藍藻を選択した。オシラトリア (Oscillatoria) 属に関する研究は、「光合成微生物による水素生産」(鈴木周一編; バイオマス・エネルギー変換、講談社・サイエンスフィック、pp. 194~228 [1983]) に総括・報告されている。水素生産能力の強力なオシラトリア (Oscillatoria) として、オシラトリア (Oscillatoria) sp. Miami BG7 が知られており、嫌気明の培養条件ではあるが、次のような研究報告がある。

\* 嫌気明での水素生産反応式

$\text{グリコゲン} + (n-1)\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

※  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6\text{CO}_2 + 12\text{H}_2$

る新規のエネルギー生産技術である。このオシラトリア (Oscillatoria) 属は、前記した通り、光エネルギーが存在しない、所謂、嫌気暗の条件下でも環境変動に対して順応性があり、基質として糖類、低級脂肪酸類を異化及び資化して、通常の微生物が嫌気性、好気性で有機物を分解すると同様な代謝への容易な転換が可能であり、解糖系、TCA サイクル系で高エネルギー物質 ATP と NAD の還元型を生成し、最終的に有機物を理論的に完全分解する。

【0033】この原核生物であるオシラトリア (Oscillatoria) 属が嫌気暗条件下で有機物を分解し ATP、N



AD(P)Hを生産するモデルは図1の通りである。オシラトリア (Oscillatoria) 属による嫌気暗での有機物分解過程は、解糖系、TCAサイクル系、及びチトクローム (Cytochrome) 系による電子伝達系によって構成されているが、多糖類を基質とした場合、解糖系においては3 ATP、TCAサイクル系では2 ATP、合計5 ATPの生産が予測される。本発明で主役を演ずる偏性嫌気性水素生産菌クロストリジウム (Clostridium) 属は、式4にグルコースを基質とした場合の水素発酵反応式のように、異化工程におけるATP生産量が少量であるために吸エルゴン反応であり、水素発生量が少ないだけでなく、発酵消化液に多量の低級脂肪酸が蓄積する。

【0034】この水素発酵反応式を完結させるためには、表1に示したように約2.2 molのATPが不足する。従って本発明のもう一つの構成要因であるクロストリジウム (Clostridium) 属と光合成微生物の一種である藍藻オシラトリア (Oscillatoria) 属を混合し、共生培養することにより式4の水素生産反応式を完結するに十分なATPが供給され、式5の生物反応が遅延なく進行し、嫌気暗条件で式6が完結し、理論的にグルコース1モル当たり12モルの水素を生産することができる。このように、クロストリジウム (Clostridium) 属群と水素生産性藍藻オシラトリア (Oscillatoria) 属群を嫌気暗で混合培養することにより、従来、嫌気明条件下で水からの水素生産でしか達成できなかった12モルの水素生産を達成することが可能となり、同時に水域の強烈な汚濁源である有機性固形物をも分解することができるようになり、実用化の障害が完全に消去された。

【0035】同属種の藍藻は淡水性、海産性とも各水域に広く分布しており、本発明者は長野県、島根県、鹿児島県の天然湖沼から強力な水素生産能力を持つ淡水性、汽水性のオシラトリア (Oscillatoria) 属群を採取した。即ち本発明は特定菌株の性状に依存するものではない。淡水性オシラトリア (Oscillatoria) 属の嫌気暗条件における集積培養はATCCの616液体培地を基本培地としたが、これに有機物としてグルコース3.000 mg/リットル、酵母抽出液 (エキス) 1.500 mg/リットルを加えた。オシラトリア (Oscillatoria) 属の菌体集積物は前記の湖沼水を1リットル採取して遠心分離器 (3,000 G、10分間) で濃縮し、この濃縮物を2リットルの嫌気暗培養装置に接種し、これに前記の培養液を1リットル張込み、クロマチウム (Chromatium) 属の培養と同様に気相部の空気を窒素ガスで置換し、30℃で回分的に培養した。培養を開始してから数日経過してから徐々にガス発生が認められたが、次第にガス発生が活発となり、発生ガス組成をガスクロマトグラフで測定した結果、クロマチウム (Chromatium) 属よりは水素ガスの発生量が多かったが、それ以外のガスは殆ど炭酸ガスによって占められていた。

【0036】以上の半定量的所見は淡水性オシラトリア

ア (Oscillatoria) 属の混合細菌群について得られたものであり、純粹に分離した単一菌に関して得られたものではない。然し、実際の濃厚廃水、各種汚泥等の有機性廃棄物を対象としてクロストリジウム (Clostridium) 属とオシラトリア (Oscillatoria) 属の混合共生培養により水素生産を行なう場合には、クロマチウム (Chromatium) 属との混合共生培養に関する項で述べたように、純菌同士の混合培養を行なうよりも、それぞれ各種の菌種が混合した、所謂細菌群集を混合培養するほうが幅広い生態系を構築することができ、外部からの環境変動に対して順応性、適応性が強く、それぞれの微生物群の機能の相互補完、機能の増殖が期待される。従って、本発明では、意識的に特定の純粋菌の混合共生培養を避け、各種菌群の混合培養を選択した。

【0037】前記の3湖沼の淡水性、汽水性オシラトリア (Oscillatoria) 属をATCC 616培養液で培養した結果、次に示すオシラトリア (Oscillatoria) 属の類縁菌らしき藍藻類が検出された。

\*汽水性オシラトリア (Oscillatoria) 属

・Oscillatoria sp. (ATCC 29215)

・Oscillatoria sp. (ATCC 29135)

\*淡水性オシラトリア (Oscillatoria) 属

・Oscillatoria sp. (ATCC 29205)

・Oscillatoria sp. (ATCC 27935)

以上、本発明は、偏性嫌気性水素生産菌クロストリジウム (Clostridium) 属による水素発酵がATP生産量不足により吸エルゴン反応となり、従って有機物の完全分解が完結しないために水素生産量が少ないだけでなく、発酵消化液に多量の低級脂肪酸が蓄積するために2次処理が不可欠であるという宿命的な欠陥を根本的に解消する事を目的として発明された革新的な水素生産技術、方法である。

【0038】この技術的な問題点を抜本的に改革、改善するために本発明では、偏性嫌気性水素生産菌クロストリジウム (Clostridium) 属と光合成微生物に属する光合成細菌クロマチウム (Chromatium) 属及び/又は藍藻オシラトリア (Oscillatoria) 属を嫌気暗条件で混合共生培養し、クロストリジウム (Clostridium) 属だけの生産量では水素発酵反応を完結するに不足するATP量を光合成微生物のATP生産量で補完し、前記の生物反応を完結せしめ、汚染源となる有機物を分解すると同時に大量の水素を生産する事を目的とした新規の発想、思想による革新的なエネルギー生産方法である。本発明が、光合成微生物に水素生産を期待しているのではなく、ATP生産を期待しているという事実を認識する必要がある。

【0039】

【実施例】以下に、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 : ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属、クロマチウム (Chromatium) 属群、及びオッシラトリア (Oscillatoria) 属群の硫化物耐性濃厚有機性廃水、各種汚泥等の有機性廃棄物には殆ど例外なく可成り高濃度の硫化物を含んでいる。従って、有機性廃棄物を基質として、本発明の水素生産法により安定して多量の水素を生産するには、本発明に関与する微生物が硫化物耐性を保有していなければ現実的に成り立たない。有機物が多量に存在する環境に野性的に生息している偏性嫌気性の従属栄養性水素生産菌クロストリジウム (Clostr\*10

表 2 : 実験に供した光合成細菌、藍藻の培養条件

菌株、或いは属群	液 体 培 地	培養温度	培養方法	培養日数
ロドバクター カプスラタス Rhodobacter capsulatus (Rhodopseudomonas) ATCC 11166	ATCC 1139 グルコース 3.000mg/l 酵母エキス 1.500mg/l 硫黄イオン 1.000mg/l	30℃	嫌気暗	20日 (回分培養)
クロマチウム (Chromatium) 属群 (淡水性) (硫黄泉)	ATCC 37 酢酸塩 3.000mg/l 酵母エキス 1.500mg/l (Na <sub>2</sub> S-S 3.000mg/l)	30℃	嫌気暗	20日 (回分培養)
オッシラトリア (Oscillatoria) 属群 (天然湖沼水)	ATCC 616 酢酸塩 3.000mg/l 酵母エキス 1.500mg/l 硫黄イオン 1.000mg/l	30℃	嫌気暗	20日 (回分培養)

【0041】硫黄泉から得た淡水性クロマチウム (Chromatium) 属群は、同温泉水を数リットル採取し、遠心分離器で分離濃縮した菌体群を2リットルの嫌気暗培養槽に接種し、表2に示した培養液を1リットル張込み、気相部の空気を窒素ガスで置換したのち、30℃の温度条件で20日間回分培養を行なった。ロドバクター カプスラタス (Rhodobacter capsulatus) ATCC 11166株はATCCから購入し、ATCC1139培地に表2に示した濃度のグルコースと酵母エキスを加え、スラント培養した菌体を液体培養液1リットルに1白金耳接種し、培養条件、方法はクロマチウム (Chromatium) 属群の培養に準じて行なった。オッシラトリア (Oscillatoria) 属群の培養も前記に準じて行なったが、ロドバクター カプスラタス (Rhodobacter capsulatus) ATCC 11166株、及びオッシラトリア (Oscillatoria) 属群の嫌気暗培養では、当初は硫黄イオンは添加せず、回分培養を開始してから10日目にはNa<sub>2</sub>S・9H<sub>2</sub>Oを硫黄イオンとして1,000mg/リットルとなるように注入し、全ての細菌について20日間における菌数変動(菌体濃度)を測定した。回分培養実験の結果を図2に示した。図において、●-●はクロマチウム属

\* idium)属は本来硫化物耐性が高いが、該菌と混合共生培養する光合成微生物は基本的には硫化物に対して感受性が強く、硫化物耐性が弱い。各微生物の供試試料のうち、クロマチウム (Chromatium) 属群、及びオッシラトリア (Oscillatoria) 属群の試料、使用培地、培養条件、嫌気暗培養装置は次に記載したとおりであり、ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属の各条件と共に、表2に総括すると次の通りである。

【0040】

【表2】

群(a)、○-○はオッシラトリア属群(b)、▲-▲はロドバクター カプスラタスATCC 11166株(c)である。

【0042】(1)当然ではあるが、クロマチウム (Chromatium) 属は紅色硫黄細菌とも云われる光合成細菌であり、硫化物を電子供与体として利用できるので、嫌気暗、従属栄養条件で有機物を異化、資化しながら順調に増殖する。従って、本発明のクロストリジウム (Clostridium) との嫌気暗条件での混合共生培養は成立する。

(2)水素生産性藍藻であるオッシラトリア (Oscillatoria) 属も嫌気暗、従属栄養条件で比較的順調に増殖する。然し、硫化物の影響を若干受けて増殖阻害が認められるが、次第に硫化物の毒性に馴養され、一旦減衰した増殖速度に回復傾向が認められる。

(3)光合成細菌であるロドバクター カプスラタス (Rhodobacter capsulatus) ATCC 11166株も嫌気暗、従属栄養条件で増殖するが、硫化物の毒性を強く受け、その後に回復傾向が認められず、硫化物により不可逆的な活性阻害(増殖阻害)を受ける。

(4)以上の実験結果より、偏性嫌気性の従属栄養水素生産菌クロストリジウム (Clostridium) 属との嫌気暗条

件における混合共生関係はクロマチウム (Chromatium) 属群とオッシラトリア (Oscillatoria) 属群は構築できるが、ロドバクター (Rhodobacter) 属は構築できない事が明確となった。

【0043】実施例2：偏性嫌気性の従属栄養性水素生産菌単独、及び本発明方法による水素生産の比較実験  
国内、H県の某市に建設されている標準都市下水を対象とした下水処理場の最初沈殿池汚泥 (生汚泥) を供試材料として、本発明方法とクロストリジウム (Clostridium) 属との水素生産量について比較検討した。採取した最\*10

表3：供試最初沈殿池汚泥の理化学的性状 (5試料の平均値)

	pH	総固形物	有機物	全糖類 *1	総窒素	有機性 窒素	NH <sub>4</sub> -N	PO <sub>4</sub> -P
試料	5.8 ~6.1	45,600	35,300	28,600	1,300	1,100	210	270

(註) \*1：グルコース換算。

単位はpH以外は全てmg/リットル

硫化物はS<sup>2-</sup>として300mg/リットル前後であったが、Na<sub>2</sub>S・9H<sub>2</sub>Oを添加して500mg/リットルに調整した。

【0045】偏性嫌気性の従属栄養性水素生産菌としてはATCCからクロストリジウム ブチリカム (Clostridium butyricum) ATCC 859を購入し、培地ATCC 38の液体培地を用いて30℃で増量培養した。実験系列は下記に示した3系列であり、それぞれに主たる培養条件を付記した。

(1) 菌種クロストリジウム ブチリカム (Clostridium butyricum) ATCC 859 (対照実験)

\*培養日数：10日 (嫌気暗培養槽の有効容積 1リットル)

\*培養温度：30℃

\*混合培養液のpH：(初発8.0) 発酵期間中は無調整

\*培地ATCC 38で増量した培養液を、実験開始時に200ml注入。

(2) クロストリジウム ブチリカム (Clostridium butyricum) ATCC 859 + クロマチウム (Chromatium) 属群

\*培養日数：10日

\*培養温度：30℃

\*混合培養液のpH：発酵期間中は無調整

\*実施例1記載の増量培養液を、実験開始に200ml注入

(3) クロストリジウム ブチリカム (Clostridium butyricum) ATCC 859 + オッシラトリア (Oscillatoria) 属群

\*全ての条件は(2)に準ずる。

【0046】比較実験は、まず、表3の水質を有する供

\*初沈殿池汚泥から予め土砂分 (傾斜法で除去)、粗大固形物を除去し、大型冷蔵庫に5℃で保管し、1日当りの使用量をその都度取出し、有効容量1リットルの嫌気暗培養槽 (Fill and Draw 方式の半連続培養槽・・・容積2リットル) に供給した。実験期間中に使用した供試最初沈殿池の理化学的性状 (平均値) は表3の通りである。

【0044】

【表3】

試汚泥を(1)については800ml、(2)、(3)については600ml嫌気暗培養槽に張込み、それぞれに菌体増殖液を規定量注入して全量を1リットル (嫌気暗培養槽の容積は2リットル) とした。実験開始から1週間ほどは基質を供給すること無く、30℃の温度で培養し、ガス発生に増大傾向が認められるまでそのまま放置した。その後は、最終負荷条件の1/2程度となるように供試材料を半連続的に注入、引抜きを継続し、ガス発生を観察しながら当初に設定した負荷条件となるように供給量を増加した (約1月後)。日常観察で水素発酵がほぼ定常状態に達したとみなせる時点から、隔日に水素発生量を正確に計測し、一方発酵消化液の全糖量 (グルコース換算) を測定し、除去全糖量を求めてmol・H<sub>2</sub>/mol・C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>を算出した。この比較検証実験から得られた結果を図3に示した。図3において、●-●はクロストリジウム (1) で発酵期間のpH≒6.4、▲-▲はクロストリジウム+クロマチウム (2) で発酵期間のpH≒7.3、○-○はクロストリジウム+オッシラトリア (3) で発酵期間のpH≒7.3である。

【0047】実験結果

(1) 偏性嫌気性の従属栄養性水素生産菌クロストリジウム ブチリカム (Clostridium butyricum) ATCC 859による水素発酵は明らかにATP生産量が不足するために吸エルゴン反応となり、発酵消化液中に低級脂肪酸が3,000~4,000mg/リットル蓄積し、水素化反応は完結しなかった。そのために水素生産量は極端に少なく、約20日間の実験期間を通じてH<sub>2</sub>/C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>H

$\text{H}_2\text{O}_2$  は  $1.5 \sim 2.5 \text{ mol/mol}$  に過ぎなかった。

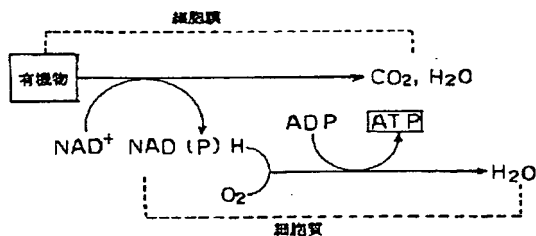
(2) これに対して、本発明の水素生産法であるクロストリジウム (*Clostridium*) + クロマチウム (*Chromatium*) の混合培養、及びクロストリジウム (*Clostridium*) + オッシラトリア (*Oscillatoria*) の混合培養における  $\text{H}_2/\text{C}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  は前者の実験では  $10 \sim 11 \text{ mol/mol}$ 、後者の実験では  $8.5 \sim 9 \text{ mol/mol}$  の高い水素発生量が得られた。また、両実験での全糖両の除去率は  $85 \sim 90\%$  の高い値を示した。

(3) 以上の検証実験の結果から、供給基質中に高濃度の硫化物が存在しても、クロストリジウム (*Clostridium*) が生産した低級脂肪酸を基質としてクロマチウム (*Chromatium*)、及びオッシラトリア (*Oscillatoria*) は過剰の ATP を生産し、この ATP をクロストリジウム (*Clostridium*) の水素生成反応に供給して水素発酵を完結させるという共役関係が確実に成立することが照明された。

【0048】

【発明の効果】以上詳細に説明、検証したように、本発明による偏性嫌気性の従属栄養水素生産菌クロストリジウム (*Clostridium*) 属と水素生産性光合成細菌である紅色硫黄細菌クロマチウム (*Chromatium*) 属及び/又は藍藻オッシラトリア (*Oscillatoria*) 属を、光エネルギー供給なしの嫌気暗条件で混合共生培養することにより、硫化物を多量に含む有機性廃棄物から安定して多量の水\*

【図1】



\*素を生産する事が可能となった。この卓越した生物学的水素生産法の確立により、次に示す格段の効果が得られる。

(1) 従来のクロストリジウム (*Clostridium*) 属の単独培養、或いは嫌気明 (光エネルギー供給) 条件での光合成微生物からの生物学的水素生産法が経済的理由と水素生産量、及び安定性の観点から実用化困難であったが、本発明により実用化が可能となった。

【0049】(2) 偏性嫌気性の従属栄養水素生産菌と光合成微生物の混合共生培養により、水素発酵の完結に不足する ATP が前者に供給されるので、水素発酵及び/メタン発酵などの所謂嫌気性細菌による発酵消化液に殆ど低級脂肪酸が分解異化、資化され、発酵消化液の汚染強度が極端に軽減される。そのために、2次処理を必要としない嫌気性処理技術が確立、出現される可能性が高い。

(3) 本発明方法に微嫌気減圧発酵法を適用することにより、本発明の効果は一段と卓越した効果が期待される。

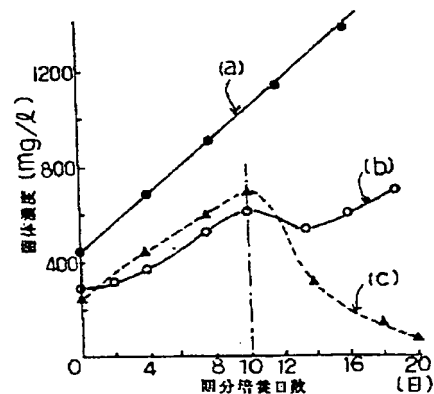
【図面の簡単な説明】

【図1】 オッシラトリア属の ATP、NAD(P)H 生産の生体機構を示す図。

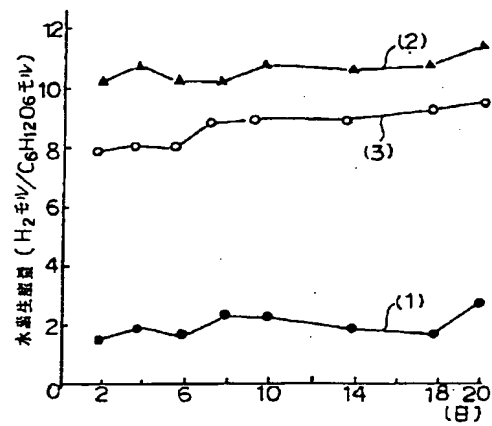
【図2】 嫌気暗回分培養における硫化物耐性実験結果を示すグラフ。

【図3】 培養方法による水素生産量の比較を示すグラフ。

【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 P 39/00

C 1 2 R 1:145

1:01)

(C 1 2 P 39/00

C 1 2 R 1:145

1:89)

(C 1 2 P 3/00

C 1 2 R 1:145

1:01

1:89)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**